

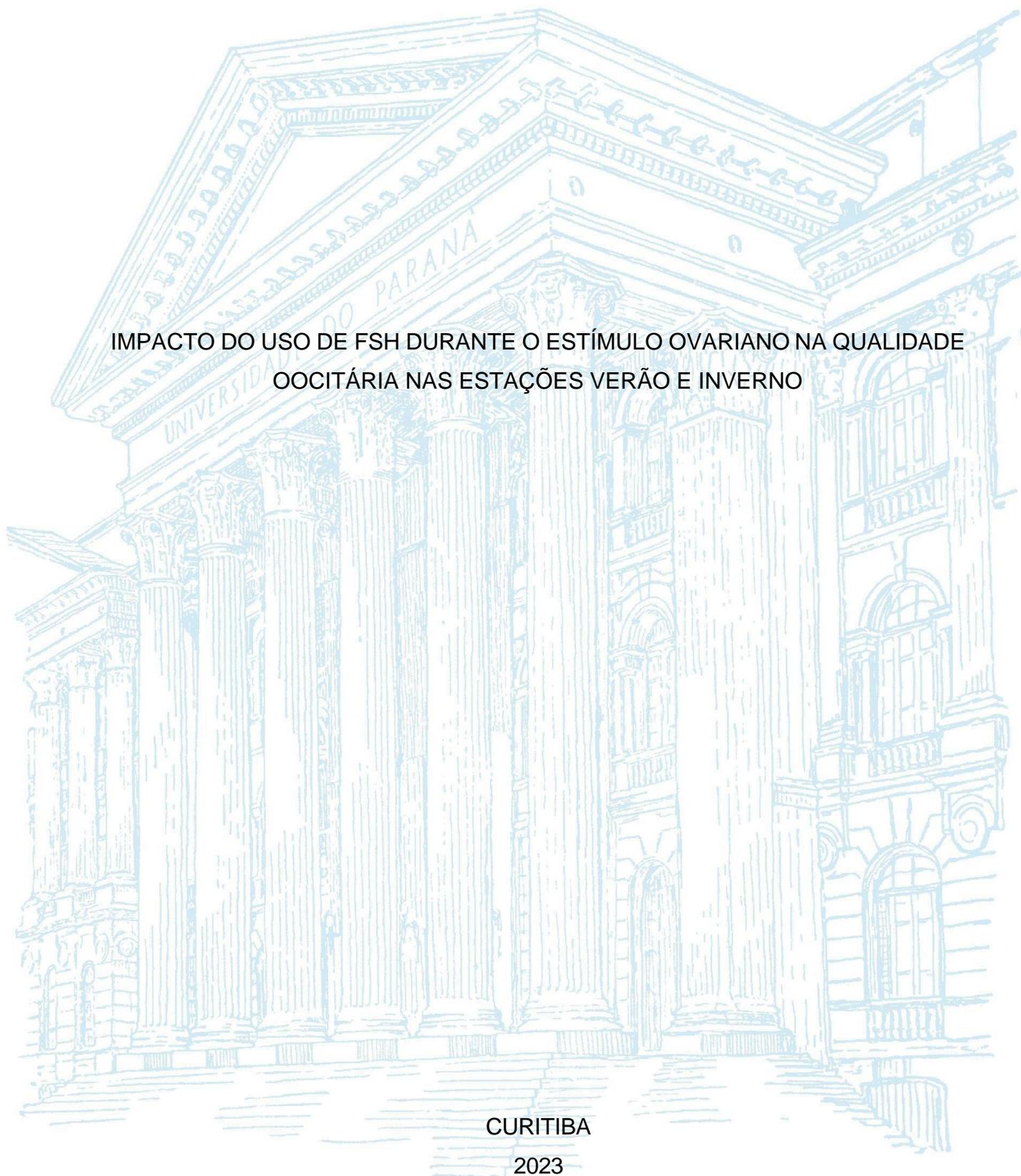
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

VANESSA DOS ANJOS RIBEIRO

IMPACTO DO USO DE FSH DURANTE O ESTÍMULO OVARIANO NA QUALIDADE
OOCITÁRIA NAS ESTAÇÕES VERÃO E INVERNO

CURITIBA

2023



VANESSA DOS ANJOS RIBEIRO

IMPACTO DO USO DE FSH DURANTE O ESTÍMULO OVARIANO NA QUALIDADE
OOCITÁRIA NAS ESTAÇÕES VERÃO E INVERNO

Artigo de Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de graduação em Biomedicina, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Orientador: Prof. Regis Yukio Cho

Coorientadora: Kahisa Natiele Fontana Dal Toso

CURITIBA

2023

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, Andrea, à minha avó, Maria do Carmo e às minhas tias, Ana, Suelen e Natally, pelo exemplo e referência de grandes mulheres em minha vida, além do amor incondicional.

Ao meu namorado e melhor amigo, Lucas, pelo companheirismo e apoio, através do seu carinho, amor e infinita paciência.

Ao meu irmão, Kauã, pelas conversas e risadas aos finais de longos dias de aulas e estágios.

Aos meus grandes amigos, Amanda, Cesar, Helena, Júlia, Pietra, Larissa, Mylena e Rafaela, pelos inúmeros momentos compartilhados.

À universidade Federal do Paraná e todo seu corpo docente, por me proporcionar tantos aprendizados e oportunidades.

Ao professor e orientador, Regis, pela confiança na minha proposta de projeto e pelo incentivo durante todo processo.

À Clínica Androlab e toda sua equipe, pelos dados fornecidos para elaboração deste estudo e por todo aprendizado e carinho que recebi ao longo do meu estágio.

À minha coorientadora e supervisora de estágio, Kahisa, por todo conhecimento transmitindo e por conduzir a avaliação morfológica dos oócitos utilizados neste estudo.

A todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação.

“Uma jornada maravilhosa da vida começa com uma única célula, uma promessa incrível contida em cada embrião.”

(Deepak Chopra)

RESUMO

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), cerca de 15% da população mundial enfrenta algum tipo de infertilidade, essa condição frequentemente exige investigações com consultas e diagnósticos especializados, tratamentos avançados e procedimentos médicos. Além dos desafios emocionais, esse processo tem custos financeiros elevados. Vários fatores podem influenciar o resultado final do tratamento como, por exemplo, a qualidade oocitária. Compreender a influência das formulações do Hormônio Folículo Estimulante (FSH) e as condições climáticas na qualidade dos oócitos podem otimizar as taxas de sucesso na *fertilização in vitro* (FIV). Foram coletados retrospectivamente dados de 141 ciclos de pacientes que realizaram tratamento em uma clínica de fertilidade localizada na cidade de Curitiba. Os ciclos foram divididos de acordo com a preparação da gonadotrofina utilizada no estímulo ovariano, FSH na forma recombinante ou urinária e, posteriormente, foram subdivididos em dois grupos sazonais, verão e inverno. A presença de distúrbios citoplasmáticos e alteração de forma do oócito foram avaliados e comparados entre os grupos. Os resultados obtidos mostraram diferença entre as gonadotrofinas utilizadas, apresentando maior frequência de alterações morfológicas de Granulação Citoplasmática ($p=0,05$), Granulação Central Escura ($p<0,01$) e Corpos Refratéis ($p=0,02$) para o grupo do FSH recombinante. Em relação às estações, não foi possível determinar de forma efetiva a interferência da sazonalidade, entretanto a aparição da Granulação Central Escura, distúrbio considerado mais grave, foi constatado no verão. Este estudo indicou desempenho mais satisfatório do FSH urinário em relação à forma recombinante e pouca influência das variações sazonais.

Palavras-chave: *Fertilização in vitro*; Infertilidade; Oócitos; Hormônio Folículo Estimulante; Sazonalidade.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Estímulo Ovariano	22
FIGURA 2 – Meios e Soluções para cultivo dos oócitos	25
FIGURA 3 - Materiais utilizados na Aspiração Folicular	25
FIGURA 4 - Equipamentos	26
FIGURA 5 - Oócito com citoplasma normal.....	26
FIGURA 6 - Oócito com granulação citoplasmática.....	27
FIGURA 7 - Oócito com Grânulação central escura (GCE).....	27
FIGURA 8 - Oócito com vacúolo.....	28
FIGURA 9 - Oócito com corpos refráteis	28
FIGURA 10 – Oócito com alteração de forma.....	29

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 - PERCENTUAL DE CADA DISMORFISMO AVALIADO EM RELAÇÃO AO USO DO uFSH E rFSH	35
GRÁFICO 2 - PERCENTUAL DA FREQUENCIA DE GCE, CR E FORMA DO OÓCITO COMPARANDO VERÃO E INVERNO EM RELAÇÃO AO TIPO DE FSH.....	36

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – NÚMERO DE CICLOS E OÓCITOS ANALISADOS.....	30
TABELA 2 - DADOS ANTROPOMÉTRICOS E ACHADOS OOCITÁRIOS CONFORME A FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA DO FSH	31
TABELA 3 - ALTERAÇÕES CITOPLASMÁTICAS MORFOLÓGICAS EM RELAÇÃO AO TIPO DE FSH UTILIZADO NO ESTÍMULO OVARIANO INDEPENDENTE DA ESTAÇÃO	32
TABELA 4 - ALTERAÇÕES CITOPLASMÁTICAS MORFOLÓGICAS NO PERÍODO DO VERÃO	32
TABELA 5 - ALTERAÇÕES CITOPLASMÁTICAS MORFOLÓGICAS NO PERÍODO DO INVERNO	33

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

RA	- Reprodução Assistida
FIV	- <i>Fertilização in vitro</i>
ICSI	- Injeção Intracitoplasmática de Espermatozoides
IUI	- Inseminação Intrauterina
AF	- Aspiração Folicular
FSH	- Hormônio Folículo Estimulante
LH	- Hormônio Luteinizante
GnRH	- Hormônio Liberador de Gonadotrofinas
hCG	- Gonadotrofina Coriônica Humana
HMG	- Gonadotrofina Menopáusica Humana
uFSH	- FSH urinário
rFSH	- FSH recombinante
US	- Ultrassonografia
CFA	- Contagem de Folículos Antrais
PI	- Prófase I
MI	- Metáfase I
MII	- Metáfase II
ZP	- Zona Pelúcida
EPV	- Espaço Perivitelino
CP	- Corpúsculo Polar
CR	- Corpos Refráteis
CGE	- Granulação Central Escura
MHM	- Multipurpose Handling Medium
SSS	- Serum Substitute Supplement
CSCM	- Continuous Single Culture Medium
OMS	- Organização Mundial da Saúde
SBRA	- Sociedade Brasileira de Reprodução Assistida
ESHRE	- Sociedade Europeia de Reprodução Humana e Embriologia
CDC	- Centro Americano de Controle de Doenças

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 OBJETIVOS	19
2 MATERIAIS E METÓDOS	20
2.1 AMOSTRAGEM.....	20
2.2 TRATAMENTO	21
2.3 ANÁLISE LABORATORIAL	22
2.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	29
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	38
4.1 RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	38
REFERÊNCIAS.....	39

1 INTRODUÇÃO

A infertilidade é uma condição clínica que afeta pessoas de diferentes classes sociais, idade e gênero. Além de não ter um padrão, ela vem se tornando cada vez mais comum ao longo das últimas décadas (Khakbazan et al., 2020; Mascarenhas et al., 2012). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) a infertilidade é um problema que atinge cerca de 15% da população mundial, mais de 180 milhões de indivíduos, além disso, de acordo com a Sociedade Brasileira de Reprodução Assistida (SBRA), no Brasil, cerca de 8 milhões de pessoas podem ser inférteis (Alirezai et al., 2022; Khakbazan et al., 2020; Mascarenhas et al., 2012). Estes dados sugerem a infertilidade como um problema global de saúde pública que, na maioria das vezes, é desconhecido pela população, além de possuir recurso terapêutico com custo muito elevado sendo, muitas vezes, um privilégio da elite.

Para definir o tratamento adequado, é necessário identificar a causa da infertilidade, observar se a mesma decorre de um fator feminino, masculino ou ambos. A partir disso, pode-se traçar um plano médico. Os procedimentos relacionados à fertilidade incluem o estímulo ovariano, coito programado, inseminações intrauterinas (IIU) e técnicas de Reprodução Assistida (RA) que, de acordo com o Centro Americano de Controle de Doenças (CDC), correspondem à técnicas em que oócitos e embriões são manipulados (Félis e Almeida, 2016; Jain et al., 2023). São consideradas técnicas de RA a aspiração folicular (AF), *fertilização in vitro* (FIV), injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) e criopreservação de óvulos e/ou embriões (Félis e Almeida, 2016). O estímulo ovariano é o passo inicial, pois através dele obtêm-se as células para dar continuidade ao tratamento, desde o coito programado até as técnicas de RA propriamente ditas.

O estímulo ovariano é um tratamento que inclui o uso de medicamentos para induzir os ovários a desenvolverem múltiplos folículos, esperando que em cada um contenha um oócito (Chamy et al., 2022). Os medicamentos utilizados são o Hormônio Folículo Estimulante (FSH) - responsável por estimular o desenvolvimento dos folículos ovarianos, combinado com agonistas ou antagonistas do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) - que atuam prevenindo a ovulação prematura e auxiliam a regulação do momento da ovulação e, por fim, a Gonadotrofina Coriônica Humana (hCG) - responsável por simular o pico de Hormônio Luteinizante (LH) e induzir a maturação final dos oócitos e sua liberação (Jain et al., 2023; Chamy et al., 2022)

Todo o processo do estímulo é acompanhado através de ultrassonografia e exames de sangue que avaliam os níveis hormonais, para garantir que os ovários estejam respondendo adequadamente ao estímulo (Jain *et al.*, 2023). O protocolo e medicações utilizadas variam de acordo com o médico, clínica e o paciente (Bertrand, E., *et al.*, 1995; Chamy *et al.*, 2022).

A escolha do tipo de FSH nos tratamentos de fertilidade pode desempenhar papel significativo em relação à qualidade dos oócitos (Patki *et al.*, 2018). Existem duas principais formas de FSH utilizadas nesses procedimentos: o Hormônio Folículo Estimulante na forma recombinante e a Gonadotrofina Menopáusica Humana (HMG), que nada mais é que o Hormônio Folículo Estimulante urinário (Patki *et al.*, 2018). O FSH recombinante é produzido por meio de técnicas de engenharia genética que envolvem a expressão do gene humano responsável pela produção do hormônio em microrganismos, resultando em uma versão purificada e molecularmente idêntica ao FSH humano (Patki *et al.*, 2018, Revelli *et al.*, 2006). Por outro lado, o FSH urinário é elaborado através de várias etapas de purificação da urina bruta de mulheres pós-menopáusicas a fim de obter boa concentração do FSH, podendo haver pouca concentração de Hormônio Luteinizante (LH) no produto final (Patki *et al.*, 2018; Yu *et al.* 2023). Em relação a pureza e menores probabilidades de desencadear respostas imunológicas adversas, o FSH recombinante destaca-se (Balasch *et al.*, 2003; Patki *et al.*, 2018; Revelli *et al.*, 2006).

Além das medicações empregadas durante o estímulo ovariano para técnicas de RA, alguns estudos apontam que a sazonalidade pode ser considerada como uma possível interferência nos resultados finais de RA. Observou-se que as taxas de natalidade em concepções naturais variam de acordo com as estações do ano, possivelmente devido a influências culturais e/ou ambientais (ref). Entretanto, a relação entre a fertilização *in vitro* (FIV) e a sazonalidade ainda é objeto de debate em virtude dos dados conflitantes (Farland *et al.*, 2020). Estudos indicam que não há diferença significativa nas taxas de sucesso de FIV nas diferentes estações do ano (Liu *et al.*, 2019; Abdelwehab *et al.*, 2018; Correia *et al.*, 2022; Pekcan *et al.*, 2019), outros estudos apontam que há uma pequena variação sazonal nas taxas de fertilização, qualidade embrionária, gestacional e de natalidade (Deutch e Sherbahn, 2011; Xiao *et al.*, 2018). Por fim, há estudos que apontam que a sazonalidade

interfere significativamente nas taxas da FIV (Farland et al., 2020; Noory et al., 2016; Vandekerckhove et al., 2016).

O papel do oócito é extremamente fundamental para o desenvolvimento do embrião e o sucesso na RA (Figueira et al., 2015). Dessa forma, é importante avaliar a qualidade oocitária, tendo em vista que fatores externos e internos causam interferências em sua qualidade. O ambiente em que o oócito é cultivado interfere, por isso os cuidados com materiais e meios de cultivo utilizados, além das temperaturas e umidade do ambiente, tempo de manuseio e exposição à luz devem ser priorizados e respeitados dentro de um laboratório de embriologia (ESHRE, 2015). Fatores como idade da mulher, hábitos de vida e exposição a toxinas também possuem interferência na qualidade oocitária. A avaliação da qualidade oocitária é realizada de acordo com o estágio de maturação e através da análise morfológica dos oócitos. A classificação dos oócitos em relação à sua maturação é realizada mediante as fases da ovogênese, dessa maneira o oócito pode estar em Prófase I (oócito PI), Metáfase I (oócito MI) e Metáfase II (oócito MII) (Ebner et al, 2008a/b; Figueira et al., 2015). Por sua vez, a análise morfológica é caracterizada pelas alterações de parâmetros citoplasmáticos e extracelulares. Referente às incorreções internas, considera-se granulação e coloração do citoplasma, presença de vacúolos e corpos refráteis (CR) (Ebner et al, 2006). Na região externa, são incluídas irregularidades de tamanho e forma do oócito e zona pelúcida (ZP), tamanho do espaço perivitelino (EPV) e anormalidades presentes no corpúsculo polar (CP), como tamanho, forma e fragmentação (Ebner et al, 2008a/b). Essas alterações são denominadas dismorfismos.

A avaliação da região do citoplasmática do oócito é frequentemente considerada mais relevante do que a avaliação extracelular quando pensamos nos procedimentos de RA, pois o citoplasma contém reservas nutritivas, enzimáticas e moleculares essenciais para o desenvolvimento inicial do embrião (Balaban et al.,2008; Kahraman et al., 2000;). As imperfeições citoplasmáticas do oócito estão associadas a desordens genéticas e, conseqüentemente, ao risco de anomalias cromossômicas no embrião, diminuindo suas chances de ser fertilizado e se desenvolver normalmente (Balaban et al., 2008).

Considerando a escassez de informações e dados conflitantes de outros estudos sobre o tema, neste trabalho buscamos fornecer uma visão abrangente dos fenômenos embriológicos, contribuindo para o avanço do conhecimento científico e

sua aplicação em áreas de interesse. Através da análise da morfologia dos oócitos de pacientes submetidas à AF, realizamos um estudo para identificar e estabelecer, se houver, uma relação de interferência entre o uso das diferentes formas farmacêuticas do FSH (urinário ou recombinante) no estímulo ovariano e o impacto na qualidade oocitária nos períodos de verão e inverno.

1.1 OBJETIVOS

Avaliar a presença de dismorfismos nos oócitos de pacientes em idade reprodutiva submetidas ao procedimento de Aspiração Folicular (AF) para criopreservação de oócitos ou Injeção Intracitoplasmática de Espermatozoides (ICSI) em relação ao uso das duas formas terapêuticas do FSH durante o estímulo ovariano.

Avaliar se houve influência das estações verão e inverno nas alterações morfológicas encontradas nesses dois grupos.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 AMOSTRAGEM

Foram utilizadas amostras de um grupo de mulheres em idade fértil, entre os 18 e 35 anos, que receberam atendimento durante as estações de verão e inverno entre os anos de 2017 e 2020 na Androlab – Clínica e Laboratório de Reprodução Humana e Andrologia, localizada na cidade de Curitiba, Paraná. Este grupo de pacientes realizou a estimulação dos ovários de acordo com a prescrição de cada médico da clínica e foram submetidas à AF para dois tipos de procedimentos de RA: técnica de ICSI e criopreservação de óvulos. Para este estudo selecionamos apenas as pacientes que usaram o FSH durante o estímulo ovariano, resultando em 141 ciclos com um total de 1.482 oócitos analisados. Desses, 835 oócitos foram procedentes de um grupo de 71 pacientes com indução ovariana por FSH urinário (uFSH) e 647 de um grupo de 70 mulheres que realizaram o estímulo com FSH recombinante (rFSH). Posteriormente, os oócitos foram organizados conforme a estação do ano em que foram coletados, verão ou inverno.

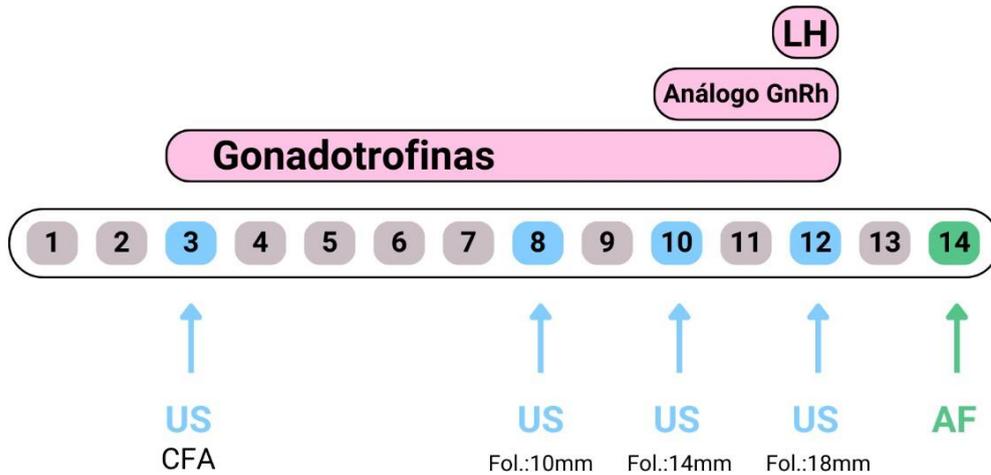
A fim de uniformizar e aumentar o nível de confiança do estudo, foram estabelecidos critérios de inclusão e exclusão. Os critérios de inclusão aplicados foi faixa etária considerada fértil (de 18 a 35 anos); pacientes avaliadas com reserva ovariana satisfatória de acordo com os critérios definidos pelo Consenso de Bologna (Ferraretti et al., 2011) e obrigatoriamente o uso do uFSH ou rFSH durante o estímulo ovariano. Os critérios de exclusão considerados foi histórico clínico indicando baixa reserva ovariana; condições que resultam na piora da qualidade oocitária, como doenças genéticas, quimioterapia e radioterapia, ooforectomia ou ooforoplastia (Nelson, 2009; Rasool; Shah, 2017); diagnóstico de má respondedora, caracterizado por corresponder ao menos dois critérios definidos pelo Consenso de Bologna (Ferraretti et al., 2011) e ausência do uso do FSH durante o ciclo.

Este estudo faz parte do projeto guarda-chuva de pesquisa “Influências externas em Reprodução Assistida” e foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Federal do Paraná sob o número 32850520.7.0000.0102.

2.2 TRATAMENTO

Todas as pacientes deste estudo foram submetidas ao protocolo de indução ovariana com gonadotrofinas, utilizando o uFSH ou rFSH, sendo a escolha dos medicamentos uma preferência pessoal de acordo com a avaliação clínica de cada médico. Durante a menstruação foi observada a presença dos folículos antrais, que são folículos pequenos, com diâmetro entre 2 a 8mm. No terceiro dia do ciclo o médico realizou a contagem dos folículos antrais (CFA) através de uma ultrassonografia (US) e estabeleceu a quantidade esperada de oócitos na aspiração conforme o número de folículos encontrados em cada paciente, sendo que o protocolo convencional estipula como meta entre 5 a 20 oócitos por paciente. Em um ciclo natural, sem o estímulo ovariano, espera-se que apenas um desses folículos continue a crescer e se desenvolver sob influência do FSH natural, no caso do tratamento para infertilidade a administração das gonadotrofinas faz com que vários cresçam e se desenvolvam. Após estabelecer a meta de folículos de cada paciente, o médico iniciou o estímulo e depois de 5 dias foi realizada uma nova US para avaliar os folículos e ajustar a dose da medicação, se necessário. As US continuaram a cada 2 dias para controle folicular até o folículo dominante atingir 14mm, nesse momento o antagonista de GnRH foi administrado a fim de impedir a maturação e ruptura folicular antecipada, o controle teve continuidade até o folículo atingir 18mm de diâmetro médio, neste momento foi programado pelo médico o pico de LH com o hCG 35 horas antes da AF. Nesta etapa, com o objetivo de avaliar se há ou não a influência do tipo de FSH utilizado na qualidade oocitária. Distribuíram-se as pacientes e os oócitos obtidos em subgrupos de acordo com a medicação utilizada, o medicamento Fostimon® representou o uFSH e os medicamentos Puregon®, Gonal®, Elonva®, Rekovelle® e Pergoveris® representaram o rFSH.

FIGURA 1 – Estímulo Ovariano



FONTE: O autor (2023).

LEGENDA: 1 – 14, dias do ciclo; ultrassonografia (US); contagem de folículos antrais (CFA); folículo (Fol.); aspiração folicular (AF); gonadotrofinas; hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRh); hormônio luteinizante (LH).

2.3 ANÁLISE LABORATORIAL

A fim de aumentar a confiabilidade do estudo, apenas os oócitos foram avaliados, excluindo a avaliação de embriões, pois dessa forma a influência do fator masculino foi desconsiderada. Todos os oócitos foram avaliados pela mesma embriologista com o objetivo de padronizar a classificação.

As pacientes foram submetidas a AF no centro cirúrgico da clínica Androlab. O líquido folicular foi aspirado e depositado diretamente em tubos Falcon® de 14ml, após o conteúdo foi despejado sobre a placa de punção Falcon® (100x100mm) posicionada acima de uma platina aquecida a 37°C. Com o auxílio de um estereomicroscópio modelo SMZ800 da Nikon® (Figura 4), no aumento de 1x, a embriologista buscou identificar o Complexo Cumulus Oophorus, estruturas em que os oócitos ficam envolvidos. Ao identificar a presença dos oócitos, os mesmos foram separados do conteúdo folicular com o auxílio de uma pipeta de vidro Origio® (Figura 3) e transferidos para uma placa de quatro poços Ingamed® (Figura 3), contendo em cada poço 0,5 ml de meio Multipurpose Handling Medium (MHM) da Irvine Scientific® (Figura 2), suplementado a 15% com Serum Substitute Supplement (SSS) também da Irvine Scientific® (Figura 2), cobertos com 0,5 ml de óleo mineral da Irvine Scientific® (Figura 2), na parte externa aos poços da placa continha 2 ml de meio de cultivo

MHM. Cada oócito encontrado foi lavado nos dois primeiros poços da placa e armazenado no terceiro poço. Todos os oócitos captados durante o procedimento permaneceram no terceiro poço da placa até o término da AF. Após a finalização da AF, as células foram realocadas em uma placa de poço central (Figura 3) com Continuous Single Culture Medium (CSCM) Spectrum® + 15% de SSS e incubados a 37°C. Cerca de 2 horas e 30 minutos após a AF os oócitos foram submetidos ao processo de denudação, que consiste na remoção das células do cumulus, dividido nas fases química e mecânica. Na etapa química, foi adicionado em uma placa 50µL do reagente enzimático Hyaluronidase Solution Irvine Scientific® (Figura 2), distribuídos igualmente em duas gotas centrais e, de acordo com a quantidade de células, de quatro a oito gotas com 500µL suplementado com 15% de SSS cada. Em seguida os oócitos passaram pelas duas gotas centrais de solução enzimática permanecendo 15 segundos em cada, sendo cuidadosamente aspirados e expelidos e, ao término desse processo, foram lavados na solução MHM para retirar totalmente os resquícios da enzima. Para finalizar a limpeza, na etapa mecânica foi utilizada a pipeta Stripper Origio® (Figura 3) com ponteiras de 175mm e 135mm de diâmetro para aspirar e expelir os oócitos delicadamente, buscando retirar todo o cumulus remanescente após a denudação química. Os oócitos voltaram a ser incubados em uma placa de cultivo a 37°C até o momento da ICSI ou Criopreservação. Antes de serem submetidos às técnicas de RA foram realizadas imagens dos oócitos pelo programa Octax® com o auxílio do microscópio invertido modelo Nikon Eclipse TI-S® (Figura 4) no aumento de 20x para ser realizada a análise da qualidade oocitária.

Foi realizada uma análise retrospectiva das imagens de todos os oócitos, conduzida e elaborada pela embriologista sênior da clínica. A classificação da qualidade dos oócitos baseou-se nos critérios de maturidade e morfologia. Os oócitos em Prófase I (PI) e em Metáfase I (MI) foram considerados imaturos, portanto foram desconsiderados da pesquisa. Os oócitos avaliados e considerados maduros foram os que se encontravam em Metáfase II (MII). Em relação à morfologia, foi avaliada a presença ou ausência de alterações na forma, ZP, citoplasma e EPV. As anomalias referentes ao CP foram integradas e avaliadas no conjunto do EPV.

Para este estudo, foram ponderadas as irregularidades citoplasmáticas. Presença de granulação citoplasmática, granulação central escura (CGE), vacúolos, corpos refráteis (CR). Os dois tipos de granulações podem afetar negativamente os

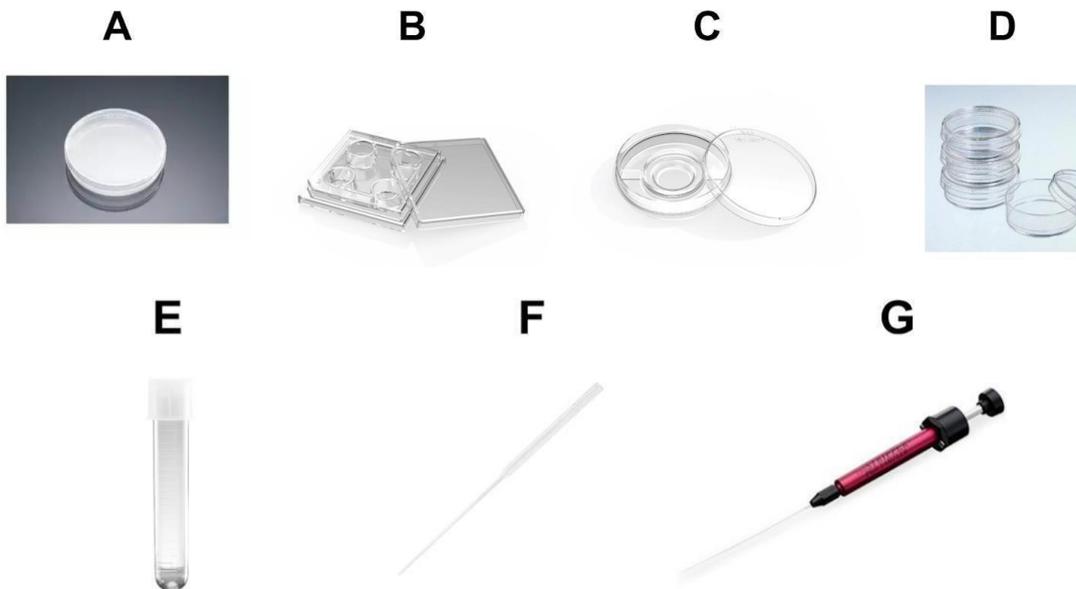
oócitos, as granulações citoplasmáticas (Figura 6) alteram as características de fluxo citoplasmáticos, fazendo com que oócito retorne lentamente ou não retorne em sua forma esférica original, causando prejuízos para o desenvolvimento embrionário, pois a forma alterada (Figura 10) pode ocasionar o atraso da formação do blastocele e sua expansão, ou até mesmo a impossibilidade de formação de blasto e, posteriormente, embrião (Ebner et al., 2006). Outra possível causa de alteração de forma (Figura 10) do oócito é o estresse mecânico, que pode ser decorrente da aspiração do folículo e/ou dos processos de denudação (Ebner et al., 2006). Por sua vez, a granulação central escura (Figura 7) é caracterizada pela presença de um grânulo de pigmentação escura situado no núcleo do oócito no citoplasma dos oócitos, essa característica morfológica normalmente surge no início do processo de maturação e está relacionada ao aumento do risco de aneuploidias (Ebner et al., 2006). Os vacúolos (Figura 8) são estruturas que se formam espontaneamente e/ou através da fusão de vesículas procedentes do Retículo Endoplasmático Liso e do Complexo de Golgi, eles podem variar de quantidades e tamanhos e contém em seu interior um líquido bastante semelhante ao do EPV, eles estão relacionados a mudanças na expressão gênica e a má regulação do cálcio, prejudicando o desenvolvimento embrionário. (Balaban et al., 2008; Ebner et al., 2006). Os corpos refráteis (Figura 9) são estruturas arredondadas e constituídas por conteúdo lipídico e partículas compactas, que apesar de ser uma alteração não apresenta efeito significativo na qualidade oocitária (Figueira et al., 2015). Durante o momento da denudação, química e mecânica, para retirar as células do cumulus, é observado que mais de 60% dos oócitos coletados apresentam características morfológicas alteradas (Balaban et al., 2008). Portanto, é comum algumas alterações presentes na análise microscópica das células femininas germinativas e não oferecem prejuízos à formação a formação de embriões viáveis (Rienzi et al, 2012).

Após a classificação dos oócitos, foi realizado o levantamento dos registros da estação do ano, com ênfase no verão e inverno, e também o tipo de FSH utilizado no estímulo ovariano de cada paciente com os oócitos avaliados.

FIGURA 2 – Meios e Soluções para cultivo dos oócitos

FONTE: O autor (2023). Imagens dos produtos retirados do site da Irvine Scientific®.

LEGENDA: Meios e soluções utilizados para preservação do oócito. Multipurpose Handling Medium (MHM), Irvine Scientific® (A); Serum Substitute Supplement (SSS), Irvine Scientific® (B); Continuous Single Culture Medium (CSCM) Spectrum®, Irvine Scientific® (C); Hyaluronidase Solution, Irvine Scientific® (D) e Óleo mineral, Irvine Scientific® (E)

FIGURA 3 - Materiais utilizados na Aspiração Folicular

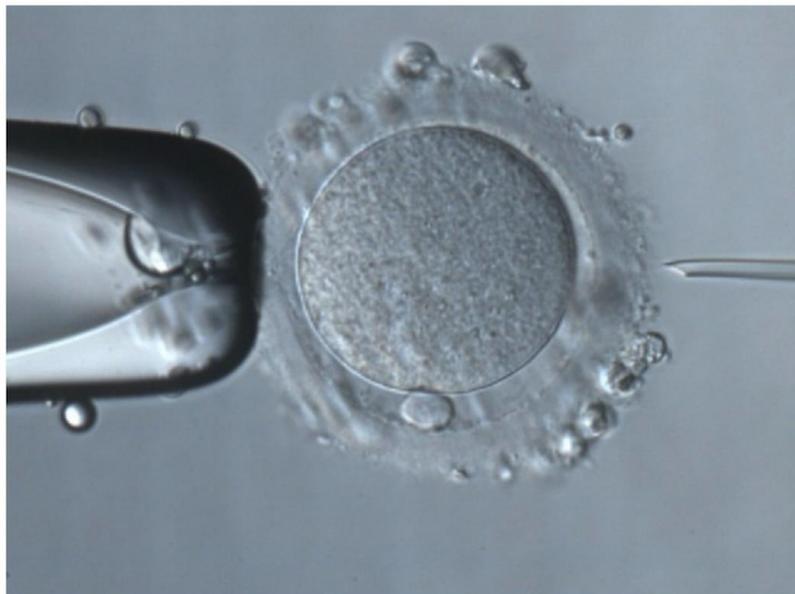
FONTE: O autor (2023).

LEGENDA: Materiais utilizados no procedimento de Aspiração Folicular. Placa de punção Falcon® (A); Placa de quatro poços Ingamed® (B); Placa de poço central Ingamed® (C); Placa de cultivo Falcon® (D); Tubo Falcon® 14ml (E); Pipeta de vidro Origio® (F) e Pipeta Stripper Origio® (G)

FIGURA 4 - Equipamentos

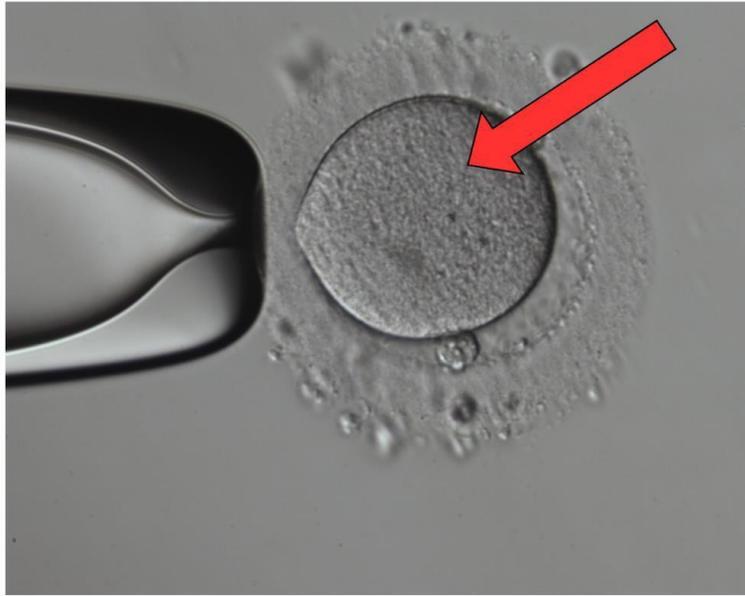
FONTE: O autor (2023). Imagem realizada no laboratório da clínica Androlab.

LEGENDA: À esquerda, estereomicroscópio ou lupa modelo SMZ800 da Nikon®, utilizado para identificar o oócito durante o procedimento de AF. À direita, microscópio invertido modelo Nikon Eclipse TI-S®, utilizado para identificar células, estruturas morfológicas e realizar ICSI.

FIGURA 5 - Oócito com citoplasma normal

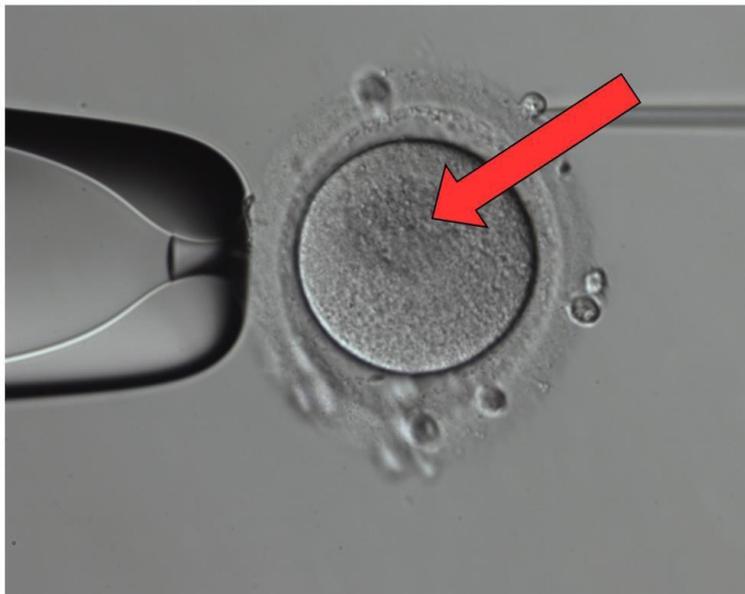
FONTE: O autor (2023). Imagem retirada do Octax®.

FIGURA 6 - Oócito com granulação citoplasmática



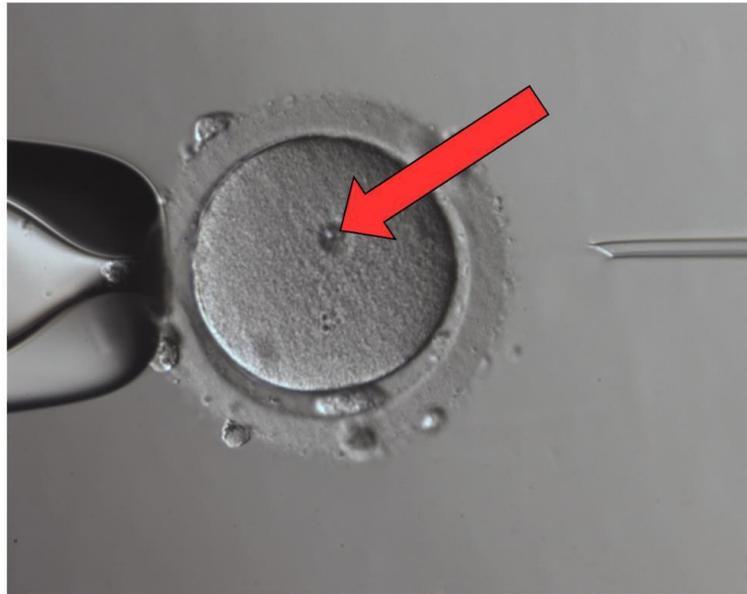
FONTE: O autor (2023). Imagem retirada do Octax®.

FIGURA 7 - Oócito com Grânulação central escura (GCE)



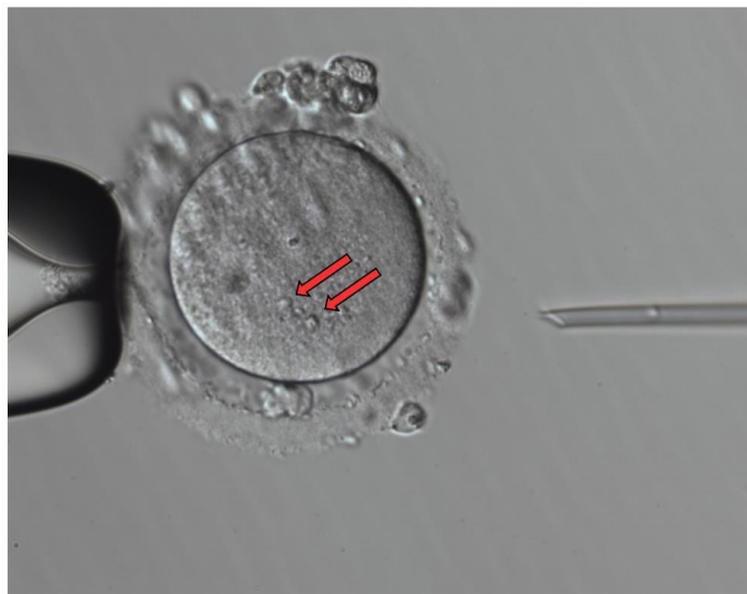
FONTE: O autor (2023). Imagem retirada do Octax®.

FIGURA 8 - Oócito com vacúolo



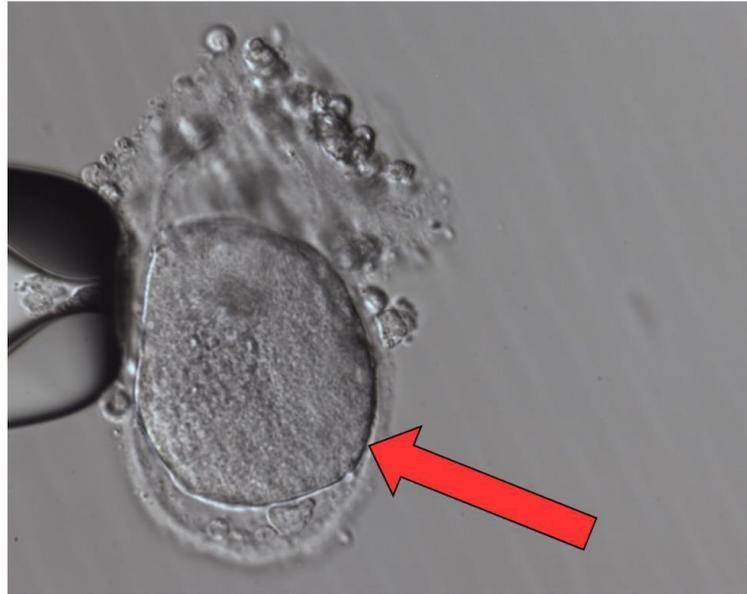
FONTE: O autor (2023). Imagem retirada do Octax®.

FIGURA 9 - Oócito com corpos refráteis



FONTE: O autor (2023). Imagem retirada do Octax®.

FIGURA 10 – Oócito com alteração de forma



FONTE: O autor (2023). Imagem retirada do Octax®.

2.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O teste de Fisher foi utilizado para avaliar as variáveis do estudo. As variáveis quantitativas que passaram no teste de normalidade tiveram seus resultados apresentados como média e desvio padrão, enquanto as variáveis qualitativas foram apresentadas em termos de frequência absoluta (número de observações em cada categoria) e frequência relativa (proporção/porcentagem de observações em cada categoria em relação ao total). O teste t de Student foi aplicado para comparar as médias entre duas amostras de dados que estão relacionadas de alguma forma, e o teste de Fisher para avaliar as diferenças significativas entre as variáveis qualitativas. O cálculo do Odds Ratio avalia a relação entre as características morfológicas dos oócitos, tipo de FSH utilizado durante o estímulo ovariano e as estações do ano.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A amostragem contou com 1.482 oócitos de 141 ciclos de tratamento. Desse total, 835 foram aspirados de 71 mulheres que realizaram a indução ovariana com uFSH, sendo 32 ciclos (45,1% do total) no verão com 447 oócitos (representando 53,5%) e 39 ciclos (54,9% do total) no inverno resultando 388 oócitos (representando 46,5%). Os 647 oócitos restantes, são de 70 pacientes que utilizaram o rFSH no tratamento, 32 ciclos (45,7% do total) foram no verão somando 317 oócitos (equivalente a 49,0%) e 38 ciclos (54,3% do total) no inverno com 330 oócitos (equivalente a 51,0%), conforme ilustra a Tabela 1. A escolha de apenas duas estações foi em consequência ao tempo de Curitiba, em que as estações de verão e inverno na cidade possuem temperaturas bem definidas e com boa variação térmica entre si, tornando possível verificar se de fato há influência sazonal. Acerca dos dados das pacientes, as médias de idade, IMC e quantidade de oócitos coletados foram expostas na Tabela 2 e não apresentaram diferenças significativas entre elas em relação às distinções farmacêuticas das medicações utilizadas no estímulo.

TABELA 1 – NÚMERO DE CICLOS E OÓCITOS ANALISADOS

	Ciclos		Oócitos		Total (n)		
	n	%	n	%	ciclos	oócitos	%
Verão/ uFSH	32	45,1	447	53,5	71	835	100
Inverno/ uFSH	39	54,9	388	46,5			
Verão/ rFSH	32	45,7	317	49,0	70	647	100
Inverno/ rFSH	38	54,3	330	51,0			

FONTE: O autor (2023).

LEGENDA: As colunas 1 e 2 são referentes ao número e percentual de ciclos e oócitos analisados, as linhas são relativas ao período e ao tipo de formulação do FSH utilizado no estímulo ovariano. Na última coluna temos os valores totais de ciclos, oócitos de uFSH e rFSH, finalizando em 100%. FSH urinário (uFSH), FSH recombinante (rFSH), quantidade (n), percentual (%)

TABELA 2 - DADOS ANTROPOMÉTRICOS E ACHADOS OOCITÁRIOS CONFORME A FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA DO FSH

Fator	uFSH (n=71)	rFSH (n=70)
	Média	Média
Idade (anos)	31,00±2,85	32,00±3,02
IMC (kg/m ²)	23,88±4,26	23,55±3,94
Quantidade de oócitos	10,00±7,28	8,50±6,12

FONTE: O autor (2023).

LEGENDA: Média e desvio padrão dos fatores idade, IMC e quantidade de oócitos das pacientes submetidas à aspiração folicular de acordo com a formulação farmacêutica do FSH utilizado no estímulo ovariano. FSH urinário (uFSH) e FSH recombinante (rFSH).

As Tabelas 3, 4 e 5 apresentam os dados referentes às cinco alterações morfológicas avaliadas e analisadas através das imagens capturadas pelo software Octax®, entre os anos de 2017 a 2020. Essas tabelas estão comparando os grupos de uFSH e rFSH independente da estação do ano, no período do verão e no inverno, respectivamente. Na Tabela 3, dos cinco parâmetros avaliados, dois apresentaram diferenças estatísticas significativas ($p \leq 0,05$), granulação citoplasmática ($p=0,05$) e forma alterada do oócito ($<0,01$), sendo a presença de granulação citoplasmática mais frequente nas células do grupo de pacientes que utilizaram rFSH e a forma atípica mais comum no de pacientes que usaram uFSH. Na Tabela 4, duas alterações também apresentaram valores estatísticos significativos ($p \leq 0,05$), GCE ($p < 0,01$) e CR ($p=0,02$), os dois dismorfismos apareceram com maior índice de frequência nos grupos de oócitos provenientes das pacientes que utilizaram rFSH durante o estímulo. Por fim, a Tabela 5, apresentou diferenças significativas ($p \leq 0,05$) novamente em apenas duas características irregulares, CR ($p=0,02$) e forma do oócito ($p=0,03$), os CR demonstraram outra vez maior frequência no grupo de rFSH e forma alterada foi constatada e, mostrou maior aparição no grupo de pacientes que utilizaram o uFSH, assim como na Tabela 3. Todos os achados presentes nas três tabelas com os valores considerados significativos, foram realizados através do Teste Exato de Fisher.

TABELA 3 - ALTERAÇÕES CITOPLASMÁTICAS MORFOLÓGICAS EM RELAÇÃO AO TIPO DE FSH UTILIZADO NO ESTÍMULO OVARIANO INDEPENDENTE DA ESTAÇÃO

Alterações FSH	GERAL						Valor de p
	Alterado		Não alterado		Total		
	n	%	n	%	n	%	
Granulação uFSH	584	69,9	251	30,1	835	100	0,05*
Granulação rFSH	482	74,5	165	25,5	647	100	
GCE uFSH	57	6,8	778	93,2	835	100	0,5
GCE rFSH	50	7,7	597	92,3	647	100	
Vacuolos uFSH	28	3,4	807	96,6	835	100	0,4
Vacuolos rFSH	16	2,5	631	97,5	647	100	
Corpos Ref uFSH	48	5,7	787	94,3	835	100	0,3
Corpos Ref rFSH	45	7,0	602	93,0	647	100	
Forma uFSH	46	5,5	789	94,5	835	100	<0,01*
Forma rFSH	16	2,5	631	97,5	647	100	

*Teste Exato de Fisher - valores <0,05 considerados significativos

FONTE: O autor (2023).

LEGENDA: Granulação Central Escura (GCE); Corpos Refráteis (Corpos Ref.); Forma do Oócito (Forma). Consideramos a presença das estruturas apresentadas na coluna "Alterações FSH" como dismorfismo. Apresentamos o número de oócitos alterados e não alterados em relação ao número total e consideramos a presença das estruturas apresentadas na coluna "Alterações FSH" como dismorfismo. Realizamos o Teste Exato de Fisher para definir quais alterações foram consideradas significativas. A tabela exibe todos os dismorfismos encontrados de acordo com o tipo de FSH utilizado no estímulo ovariano durante o período de 2017 a 2020, independente do período da análise (inverno ou verão).

TABELA 4 - ALTERAÇÕES CITOPLASMÁTICAS MORFOLÓGICAS NO PERÍODO DO VERÃO

Alterações FSH	Verão						Valor de p
	Alterado		Não alterado		Total		
	n	%	n	%	n	%	
Granulação uFSH	288	64,4	159	35,6	447	100	0,08
Granulação rFSH	224	70,7	93	29,3	317	100	
GCE uFSH	23	5,1	424	94,9	447	100	<0,01*
GCE rFSH	33	10,4	284	89,6	317	100	
Vacuolos uFSH	11	2,5	436	97,5	447	100	0,3
Vacuolos rFSH	4	1,3	313	98,7	317	100	
Corpos Ref uFSH	31	6,9	416	93,1	447	100	0,02*
Corpos Ref rFSH	38	12,0	279	88,0	317	100	
Forma uFSH	23	5,1	424	94,9	447	100	0,09
Forma rFSH	8	2,5	309	97,5	317	100	

*Teste Exato de Fisher - valores <0,05 considerados significativos

FONTE: O autor (2023).

LEGENDA: Granulação Central Escura (GCE); Corpos Refráteis (Corpos Ref.); Forma do Oócito (Forma). Consideramos a presença das estruturas apresentadas na coluna "Alterações FSH" como dismorfismo. Apresentamos o número de oócitos alterados e não alterados em relação ao número total e consideramos a presença das estruturas apresentadas na coluna "Alterações FSH" como dismorfismo. Realizamos o Teste Exato de Fisher para definir quais alterações foram consideradas significativas. A tabela exibe todos os dismorfismos encontrados de acordo com o tipo de FSH utilizado no estímulo ovariano durante o período de 2017 a 2020, na estação do verão.

TABELA 5 - ALTERAÇÕES CITOPLASMÁTICAS MORFOLÓGICAS NO PERÍODO DO INVERNO

Alterações FSH	Inverno						Valor de p
	Alterado		Não alterado		Total		
	n	%	n	%	n	%	
Granulação uFSH	296	76,3	92	23,7	388	100	0,6
Granulação rFSH	258	78,2	72	21,8	330	100	
GCE uFSH	34	8,8	354	91,2	388	100	0,08
GCE rFSH	17	5,2	313	94,8	330	100	
Vacúolos uFSH	17	4,4	371	95,6	388	100	0,7
Vacúolos rFSH	12	3,6	318	96,4	330	100	
Corpos Ref uFSH	7	1,8	381	98,2	388	100	0,02*
Corpos Ref rFSH	17	5,2	313	94,8	330	100	
Forma uFSH	23	5,9	365	94,1	388	100	0,03*
Forma rFSH	8	2,4	322	97,6	330	100	

*Teste Exato de Fisher - valores <0,05 considerados significativos

FONTE: O autor (2023).

LEGENDA: Granulação Central Escura (GCE); Corpos Refráteis (Corpos Ref.); Forma do Oócito (Forma). Consideramos a presença das estruturas apresentadas na coluna "Alterações FSH" como dismorfismo. Apresentamos o número de oócitos alterados e não alterados em relação ao número total e consideramos a presença das estruturas apresentadas na coluna "Alterações FSH" como dismorfismo. Realizamos o Teste Exato de Fisher para definir quais alterações foram consideradas significativas. A tabela exibe todos os dismorfismos encontrados de acordo com o tipo de FSH utilizado no estímulo ovariano durante o período de 2017 a 2020, na estação do inverno.

O foco da análise deste estudo foi a presença de alterações no citoplasma. Inicialmente, os retículos seriam avaliados e incluídos nos resultados, mas a sua frequência foi muito baixa, ocorrendo apenas uma vez no verão para o grupo do rFSH, possuindo percentual inferior a um, portanto foi desconsiderado e não entrou para os resultados. Contudo, uma alteração extracelular que não estava prevista para análise foi incluída, a forma do oócito alterada. Foi acrescentado esse dismorfismo por conta da associação com as granulações, uma vez que podem influenciar o formato do oócito. Além disso, a forma alterada pode indicar danos ou imperfeições nas

estruturas celulares, afetando a integridade, funcionalidade e capacidade da célula se desenvolver e tornar um embrião saudável (Ebner et al., 2006). Assim, as irregularidades morfológicas avaliadas foram: presença de granulação citoplasmática, granulação central escura (CGE), vacúolos e corpos refráteis (CR), compondo as alterações internas e a forma do oócito, único parâmetro atípico avaliado.

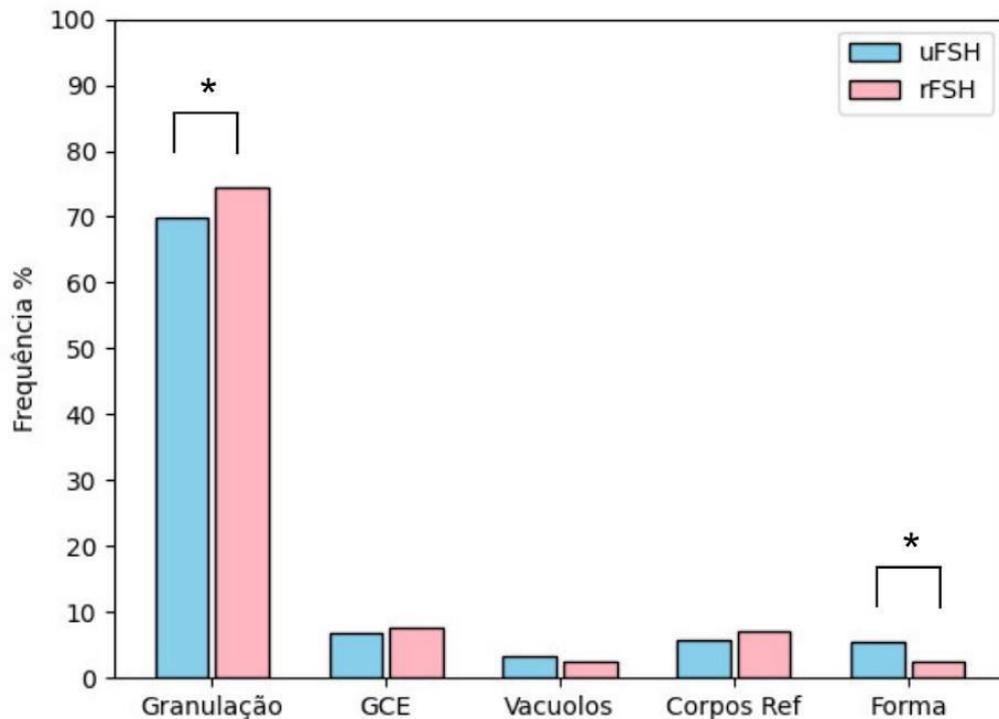
Segundo Balaban, os dimorfismos citoplasmáticos considerados mais graves são a presença de vacúolos e a GCE. O estudo do autor aponta que embriões provenientes de oócitos com a presença dessas imperfeições no citoplasma têm menores chances para desenvolver blastocistos de boa qualidade ou atingir a fase de eclosão embrionária após uma criopreservação (Balaban et al., 2008). Essas anormalidades são indicadores de baixas taxas de desenvolvimento dos blastocistos, altas taxas de aneuploidias e chances reduzidas para iniciar o processo de implantação na parede uterina (Balaban et al., 2008).

A qualidade oocitária está ligada à resposta ovariana durante a estimulação hormonal (Patki et al., 2018). Uma resposta ovariana equilibrada e controlada é essencial para otimizar a qualidade dos oócitos coletados durante o processo de RA (Patki et al., 2018). O rFSH, devido à sua pureza e consistência, muitas vezes é associado a uma resposta ovariana melhor, contribuindo para a produção de oócitos de alta qualidade (Balasch et al., 2003; Patki et al., 2018; Revelli et al., 2006). A preferência crescente pelo FSH a partir de técnicas de recombinação genética reflete os avanços tecnológicos e a busca por maior eficácia nos procedimentos de RA, buscando promover melhores resultados na obtenção de oócitos mais saudáveis (Patki et al., 2018). Porém, neste estudo, obtivemos resultados contrários a essa premissa.

Conforme a análise estatística constatamos que os resultados gerais, independente da estação do ano, foram significativos para presença de granulação no citoplasma no grupo do rFSH e forma atípica no grupo uFSH. O percentual alto na frequência de granulações é observado nos dois grupos, por se tratar de uma alteração morfológica considerada mais recorrente (Balaban et al., 2008). Porém, houve diferença significativa entre eles, os oócitos oriundos do estímulo com uFSH apresentaram um percentual de alterações menor (Gráfico 1). A forma anormal do oócito apresentou frequências menores comparadas a granulação, pois não é uma alteração tão comum, mas estatisticamente se demonstrou mais favorável ao grupo

de rFSH, com um índice de normalidade maior do que o grupo do uFSH. Os parâmetros GCE, vacúolos e CR apresentaram frequências bastante similares, com ausência de diferenças estatísticas significativas.

GRÁFICO 1 - PERCENTUAL DE CADA DISMORFISMO AVALIADO EM RELAÇÃO AO USO DO uFSH E rFSH



FONTE: O autor (2023).

LEGENDA: Relação entre a ocorrência em percentual (eixo y) e os dismorfismos analisados (eixo x). O asterisco (*) indica diferença estatística significativa confirmada pelo teste de Fisher.

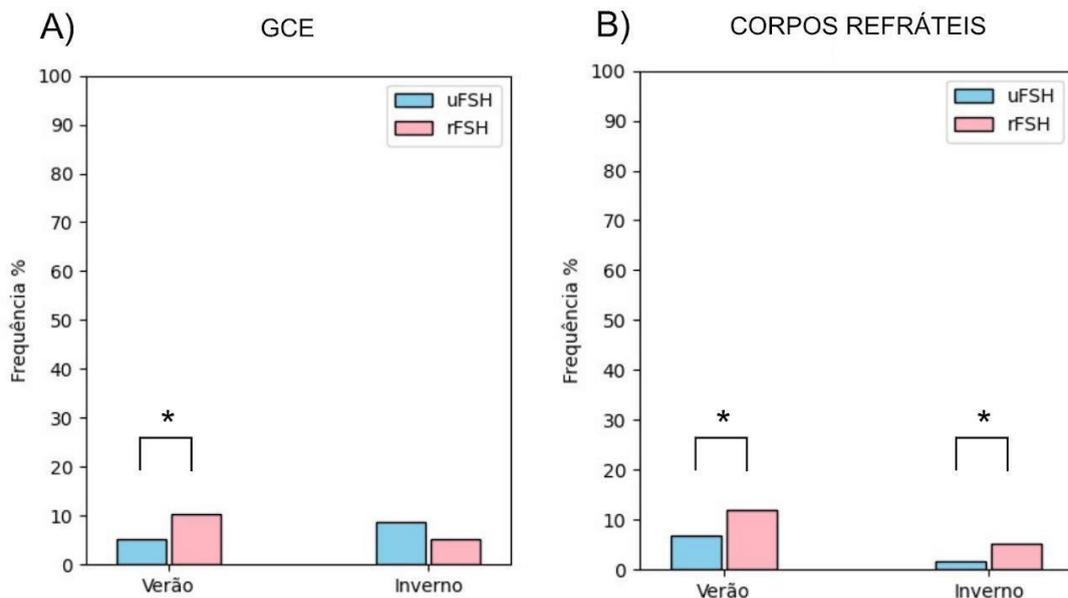
A partir da organização das células germinativas analisadas de acordo com a estação do ano em que foram coletadas, verão ou inverno, percebemos que o rFSH demonstra uma tendência mais favorável ao maior número de ocorrências de dismorfismos citoplasmáticos quando comparado ao uFSH. A forma recombinante apresentou maior percentual de alterações para GCE no verão (Gráfico 2a) e CR no verão e no inverno (Gráfico 2b). No que diz respeito a presença de GCE, a estação do verão é capaz de causar certo impacto, já que a análise dessa estação foi o único momento em que a presença desse tipo de granulação apresentou diferença estatística significativa para o grupo de rFSH. Sobre os CR, os resultados indicam a presença dessa alteração sendo influenciada mais pelo forma da manipulação da medicação do que pela estação, pois apesar de não possuir dados considerados

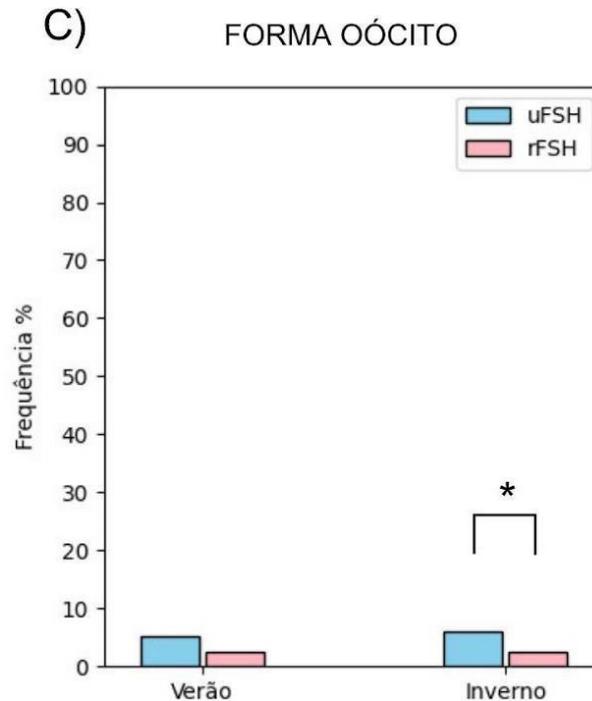
significativos para tal diferença na análise geral, ele aparece presente tanto na análise do verão como na do inverno.

Por sua vez, o uFSH apresentou diferença significativa maior para forma atípica no inverno (Gráfico 2c), sugerindo uma influência positiva do verão para esse dimorfismo em específico, dado que foi constatada a presença dessa irregularidade nas análises geral e do inverno, mas na do verão não.

As granulações não sofreram influência das estações, pois quando analisadas separadamente nos períodos de verão e inverno, não apresentam diferenças significativas. Os CR podem-se considerar que sofrem influência tanto do verão quanto do inverno, visto que aparecem com valores significativos na análise individual das duas estações, diferente da análise independente. Por fim, a presença de GCE e alteração da forma podem sofrer impacto pela estação, sendo GCE influenciada pelo verão e as alterações na forma pelo inverno.

GRÁFICO 2 - PERCENTUAL DA FREQUENCIA DE GCE, CR E FORMA DO OÓCITO COMPARANDO VERÃO E INVERNO EM RELAÇÃO AO TIPO DE FSH





FONTE: O autor (2023).

LEGENDA: Relação entre a ocorrência em percentual (eixo y) e as estações em que os oócitos foram coletados (eixo x). Análise Granulação Central Escura - GCE (A), Corpos Refráteis - CR (B) e forma oócitos (C). O asterisco (*) indica diferença estatística significativa confirmada pelo teste de Fisher.

Apesar da gonadotrofina menopáusic humana, ou FSH urinário, conter pequenas quantidades de outros hormônios em razão ao seu método de extração, nossos dados são capazes de levantar suspeitas sobre melhores respostas em relação à qualidade oocitária das pacientes que realizam o estímulo hormonal com essa forma farmacêutica. Essa informação é benéfica, pois o tratamento de fertilização in vitro possui um custo elevado e o uFSH é financeiramente mais econômico, sendo possível tornar o tratamento mais acessível ao público com problemas de infertilidade. Por sua vez, a sazonalidade demonstrou resultados pouco significativos tornando-se importante o aprofundamento nos estudos baseados na influência do clima na qualidade dos oócitos.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em conclusão, os resultados obtidos neste estudo indicam que a performance do FSH na forma recombinante em relação a qualidade oocitária, se apresentou inferior quando comparado ao urinário. Entretanto, as estações do ano não apresentaram dados suficientes para estabelecer uma correlação significativa do impacto na qualidade morfológica dos oócitos em função do tipo de medicação utilizado durante o estímulo.

4.1 RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Em função da indisponibilidade de tempo hábil para aprofundar essa pesquisa e construir uma relação mais robusta entre a classe do FSH usado e a influência sazonal, recomenda-se para trabalhos futuros a incorporação de uma revisão sistemática e análise estatística específica e direcionada para relacionar essas variáveis de forma mais assertiva.

REFERÊNCIAS

ABDELWEHAB, S.; ABDELNASSER, B.; SAMY, M. Season variability in pregnancy and live birth rates for women undergoing assisted reproductive technique: A retrospective study. **Gynecol & Reprod Health**, v. 2, n. 1, p. 1-4, 2018.

ALIREZAEI, S.; TAGHIPOUR, A.; LATIFNEJAD ROUDSARI, R. The effect of infertility counseling interventions on marital and sexual satisfaction of infertile couples: A systematic review and meta-analysis. **International Journal of Reproductive Biomedicine**, v. 20, n. 10, p. 795–806, 2022.

BALASCH, J. et al. Respostas ovarianas ao FSH recombinante ou HMG em mulheres normogonadotróficas após dessensibilização hipofisária por um agonista de GnRH depot para reprodução assistida. **Biomedicina Reprodutiva Online**, v. 1, pág. 35–42, 2003.

BALABAN, B. et al. Severas anormalidades citoplasmáticas do oócito diminuem a criossobrevivência e o desenvolvimento embrionário subsequente de embriões criopreservados. **Human Reproduction**, v. 23, n. 8, p. 1778–1785, 1 de agosto de 2008.

BERTRAND, E.; VAN DEN BERGH, M.; ENGLERT, Y. Fertilização e embriologia precoce: A espessura da zona pelúcida influencia a taxa de fertilização? **Human Reproduction**, v. 10, n. 5, p. 1189–1193, 1995.

CHAMY, Verónica et al. Medically assisted reproductive therapy assessment in 9 years: Retrospective cohort study. **Revista chilena de obstetricia y ginecología**, v. 87, n. 2, p. 90-96, 2022.

CHU, T. et al. Effects of seasonal variations and meteorological factors on IVF pregnancy outcomes: a cohort study from Henan Province, China. **Reproductive Biology and Endocrinology: RB&E**, v. 20, n. 1, p. 113, 2022.

CORREIA, K. F. B., FARLAND, L. V., MISSMER, S. A., & RACOWSKY, C. The association between season, day length, and temperature on clinical outcomes after cryopreserved embryo transfer. **Fertility and sterility**, v. 117, n. 3, p. 539–547, 2022.

DEUTCH, T. D.; SHERBAHN, R. Does the seasonal variation in the duration of daylight hours affect in vitro fertilization live birth rates? **Fertility and Sterility**, v. 96, n. 3, p. S182, 2011.

EBNER, T.; MOSER, M.; TEWS, G. Is oocyte morphology prognostic of embryo developmental potential after ICSI? **Reproductive Biomedicine Online**, v. 12, n. 4, p. 507–512, 2006.

- EBNER, T. et al. Developmental fate of ovoid oocytes. **Human Reproduction**, v. 23, n. 1, p. 62–66, 2008a.
- EBNER, T. et al. Blood clots in the cumulus-oocyte complex predict poor oocyte quality and post-fertilization development. **Reproductive Biomedicine Online**, v. 16, n. 6, p. 801–807, 2008b.
- ESHRE Guideline Group on Good Practice in IVF Labs et al. Revised guidelines for good practice in IVF laboratories (2015). **Human Reproduction**, v. 31, n. 4, p. 685–686, 2016.
- FARLAND, L. V. et al. Seasonal variation, temperature, day length, and IVF outcomes from fresh cycles. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 37, n. 10, p. 2427–2433, 2020a.
- FÉLIS, K. C.; ALMEIDA, R. J. Perspectiva de casais em relação à infertilidade e reprodução assistida: uma revisão sistemática. **Reprodução e Climatério**, v. 31, n. 2, p. 105–111, 2016.
- FERRARETTI, AP et al. ESHRE consensus on the definition of ‘poor response’ to ovarian stimulation for in vitro fertilization: the Bologna criteria. **Hum Reprod.** 2011; 26(7):1616–1624.
- FIGUEIRA, R. C. S., et al. Limitações e controvérsias na determinação do valor preditivo de critérios de morfologia oocitária e embrionária. Artigo de Revisão, **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, 37 (11). 2015
- JAIN, M.; SINGH, M. Assisted Reproductive Technology (ART) Techniques. 2023 Jun 7. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan–. PMID: 35015434.
- KAHRAMAN, S. et al. Relationship between granular cytoplasm of oocytes and pregnancy outcome following intracytoplasmic sperm injection. **Human reproduction** (Oxford, England), 15(11), 2390–2393.
- LIU, X. et al. Seasonal variation and live birth rate of IVF: a large retrospective cohort study. *Scientific Reports*, v. 9, n. 1, 17185, 2019.
- MASCARENHAS, M. N. et al. National, regional, and global trends in infertility prevalence since 1990: a systematic analysis of 277 health surveys. **PLoS Medicine**, v. 9, n. 12, e1001356, 2012.
- NOORY, L. et al. Seasonal variability in the pregnancy rate of women undergoing Intracytoplasmic Sperm Injection Technique. **Caspian Journal of Reproductive Medicine**, v. 2, n. 2, p. 1–4, 2016.
- PATKI, A. et al. Urinary Versus Recombinant Gonadotropins for Ovarian Stimulation in Women Undergoing Treatment with Assisted Reproductive Technology. **Journal of Human Reproductive Sciences**, v. 11, n. 2, p. 119-124, 2018.

PEKCAN, M. K. et al. Relationship between seasons and pregnancy rates during intrauterine insemination. **A historical cohort. Sao Paulo Medical Journal**, v. 137, n. 4, p. 379–383, 2019.

REVELLI, A. et al. Recombinant versus highly-purified, urinary follicle-stimulating hormone (r-FSH vs. HP-uFSH) in ovulation induction: a prospective, randomized study with cost-minimization analysis. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 4, 38, 2006.

RIENZI, L. et al. O oócito. **Reprodução Humana** (Oxford, Inglaterra), Suppl 1, p. i2–i21, 2012. DOI: 10.1093/humrep/des200.

VANDEKERCKHOVE, F. et al. Estações ao sol: o impacto nos resultados da fertilização in vitro um mês depois. **Fatos, Pontos de Vista e Visão em ObGyn**, v. 8, n. 2, p. 75–83, 2016.

XIAO, Y.; WANG, M.; LIU, K. The influence of seasonal variations on in vitro fertilization and fresh/frozen embryo transfer: a retrospective study. **Archives of Gynecology and Obstetrics**, v. 298, n. 3, p. 649–654, 2018.

YU, Y. et al. The therapeutic effects of rFSH versus uFSH/uHMG on ovarian stimulation in women undergoing assisted reproductive technology: a meta-analysis of randomized controlled trials. **Archives of Gynecology and Obstetrics, Advance online publication**, 2023.